

化學藥劑處理對四季蔥‘蘭陽1號’及‘桃園3號’ 去病毒效果之影響

謝叔娟¹⁾ 李文汕²⁾

關鍵字：四季蔥、培養基、化學藥劑處理、酵素連結免疫抗體法、分蔥潛隱病毒

摘要：本研究為探討 Ribavirin 及 Dithiouracil 化學藥劑處理對四季蔥瓶苗去病毒效果之影響。先以酵素連結免疫抗體法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 方法篩選‘蘭陽1號’及‘桃園3號’兩四季蔥品種之罹病株，切取帶三枚葉鞘之莖頂(含基盤)做為培植體，於瓶苗階段進行化學藥劑處理，以比較兩處理對二品種四季蔥分蔥潛隱病毒去病毒 (*Shallot latent virus, SLV*) 之效果。兩品種以 25 mg/l Ribavirin 藥劑處理 2 週後，即可完全排除 SLV，且在延長培養期間，仍可繼續維持無病毒感染的狀態。但隨著處理濃度之增加及處理時間的延長，培植體鮮重、株高、葉片數及葉綠素的含量都呈現顯著下降的趨勢。培植體以 Dithiouracil 藥劑處理者，不論處理的時間及處理濃度為何，都無法達到去病毒效果。但隨著處理濃度的增加及處理時間的延長，培植體的鮮重、株高、葉片數及葉綠素的含量都顯著的優於以 Ribavirin 藥劑處理者。

前 言

青蔥是台灣重要的蔥科蔬菜作物之一，目前主要的栽培品種包括北蔥、四季蔥及大蔥三種。由於四季蔥之種子數少，且在生長期間分蘖快，大多以分株繁殖為主(張及黃, 1998)。然而因長期營養繁殖的結果，衍生繁殖倍率低下以及營養系族群普遍感染病毒病之現象。通常作物受到病毒感染後，除生長受到抑制外，亦會導致生育變差，產量與品質、果色及風味也受到顯著影響(蔡, 2004; Manganaris *et al.*, 2003; Valera *et al.*, 2003)，最後導

1) 國立中興大學園藝系碩士班研究生。

2) 國立中興大學園藝系副教授，通訊作者。

致劇烈的減產及品質劣變（陳等, 1998; Ayabe and Sumi, 1998; Ebi *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1994; Nagakubo *et al.*, 1993; Mohamed *et al.*, 1994），嚴重影響農民之收益（Novak, 1990）。因此目前政府推致力於廣健康種苗之生產，期能克服病毒感染問題進而提高產量、改善品質，增加農民收益。然而如何鑑定病毒之種類，以及執行植物之去病毒處理，則成為健康種苗生產程序中，極為重要關鍵的問題。

應用組織培養技術繁殖無病毒健康種苗，在國內外已有許多成功之實例。許多學者嘗試利用培養基內添加抗病毒藥劑的處理，藉以排除植物病毒（陳及盧, 2000; Hansen, 1989）。抗病毒藥劑的使用方法，可以噴灑或注射在罹病植物上，或是混合在培養基內做為離體培養（Spiegel *et al.*, 1993）。本試驗之目的即在於嘗試利用組織培養技術之莖頂培養配合培養基內添加抗病毒藥劑的處理，期能用以排除植物病毒，生產無病毒之健康種苗以提供農民栽培利用。

材 料 方 法

一、試驗材料與方法

先以 ELISA 方法篩選罹病植株，切取供試樣品帶有三片葉鞘之莖頂(包含基盤部分)培養在 MS+2 mg/l BA 及 1 mg/l NAA 的培養基中進行化學藥劑處理之培植體增殖。培養室的溫度維持 25±1℃，光週期為 16 小時光照與 8 小時暗期，光強度為 3,000 lux。經培養一個月後，取瓶內之增殖芽，切割成單株後做為試驗之培植材料。為了避免植物生長調節劑對化學藥劑去病毒效果之影響，故在此皆以不含任何植物生長調節劑之 MS-free 基本培養基添加不同化學藥劑做為處理，於接種第二週、第四週、第六週及第八週後，取出做 SLV 病毒檢測，並以 MS-free 基本培養基作為對照組。本試驗所採用之去病毒藥劑及處理組合如下：

- (一) MS-free 基本培養基（對照組）
- (二) MS-free 基本培養基+25 mg/l Ribavirin
- (三) MS-free 基本培養基+50 mg/l Ribavirin
- (四) MS-free 基本培養基+75 mg/l Ribavirin
- (五) MS-free 基本培養基+100 mg/l Ribavirin
- (六) MS-free 基本培養基+5 mg/l Dithiouracil
- (七) MS-free 基本培養基+10 mg/l Dithiouracil
- (八) MS-free 基本培養基+20 mg/l Dithiouracil
- (九) MS-free 基本培養基+40 mg/l Dithiouracil

二、調查項目

- (一) 分蔥潛隱病毒（*Shallot latent virus*；SLV）罹病率調查

將四季蔥莖頂培植體接種至不同培養基培養 2、4、6 及 8 週後調查分蔥潛隱病毒去病率。分析方法為：取欲檢測之新鮮植株葉片以及經由人工接種 SLV 之奎藜罹病植株為陽性反應對照 (+Check)，不經人工接種 SLV 之奎藜健康植株為陰性反應對照 (-Check)，分別放入研磨袋中研磨，並加入 1 ml 附著緩衝溶液 (coating buffer) 均勻混合。取 100 μ l 混合液，注入 ELISA 盤中 (包括只含包覆緩衝溶液之空白試驗)，置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱內放置一夜，再以磷酸-Tween 20 緩衝溶液 (phosphate buffer saline & Tween 20, PBST) 沖洗 3 次，每次間隔 3 分鐘。拍乾 ELISA 盤後，取含有 500 倍 SLV 的包覆免疫球蛋白 (coating IgG) 100 μ l，加入 ELISA 盤中，置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱內 2 小時後，再以 PBST 沖洗 3 次，每次間隔 3 分鐘。拍乾 ELISA 盤後，取含有鹼性磷酸結合之山羊抗兔免疫球蛋白 (anti-rabbit IgG alkaline phosphate conjugate, Simga A-3687) 100 μ l，加入 ELISA 穴盤中，置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱內 2 小時後，再以 PBST 沖洗 3 次，每次間隔 3 分鐘。拍乾 ELISA 盤後，取 100 μ l ρ -雙鈉硝基苯磷酸鹽 (ρ -nitrophenyl phosphate disodium, 1mg/ml) 之鹼性磷酸酵素基質溶液，加入 ELISA 穴盤中，置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱內半小時，進行呈色反應。樣品以 ELISA 讀值機 (Multiskan Ascent, Thermo, Finland) 測定在 405 nm 之吸光值。

(二) 植株生育性狀調查

將四季蔥瓶內增殖叢生芽切割成單株接種至含不同去病毒藥劑之培養基，經培養 2、4、6 及 8 週後調查園藝性狀，調查項目包括植株鮮重、株高 (基盤至葉尖之長度)、莖徑 (基盤上方之直徑) 及葉片數。

(三) 葉綠素含量分析

將四季蔥莖頂培植體接種至不同培養基培養 2、4、6 及 8 週後，取葉片調查葉綠素含量變化，分析方法為取 0.05 g 新鮮葉片切成數片，加入 5 ml 含 80 % 丙酮及 20 % 甲醇配置之的萃取溶液中，於黑暗中放置 24 小時，待葉片完全變白後，再以分光光度計 (Spectrophotometer U-2001, SHIMADZU, Japan) 測定在 645 nm、652 nm 及 663 nm 波長下之吸光值，每處理為三重複，並利用下列公式計算單位葉重之葉綠素 a、b 及總葉綠素含量。

$$\text{Chl a (mg/g)} = (12.7 A_{663} - 2.69 A_{645}) \times V/1000/W$$

$$\text{Chl b (mg/g)} = (12.7 A_{645} - 2.69 A_{663}) \times V/1000/W$$

$$\text{Total Chl (mg/g)} = (A_{652} \times 1000/34.5) \times V/1000/W$$

V：80 % Acetone 及 20 % Methanol 萃取液之總體積 (ml)

W：葉片組織鮮重 (g)

三、統計分析

試驗採用完全隨機設計 (Completely Randomized Design, CRD)。調查所得數據以 ANOVA 進行變方分析 (analysis of variance) ($\alpha=0.05$)，以 Fisher's LSD 進行試驗間各處理平均值比較。

結 果

(一) 分蔥潛隱病毒 (*Shallot latent virus*; SLV) 罹病率調查

四季蔥‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’兩品種以不同濃度之去病毒藥劑 Ribavirin 及 Dithiouracil 處理，經不同週數後，比較其對分蔥潛隱病毒去病效果之影響。在 Ribavirin 藥劑處理 2 週後‘蘭陽 1 號’以 25 mg/l Ribavirin 藥劑處理，可完全去除培植體內之分蔥潛隱病毒，‘桃園 3 號’以 25 mg/l 及 50 mg/l Ribavirin 藥劑處理，培植體罹病率可降至 20%，隨著藥劑處理濃度提高至 75 mg/l 及 100 mg/l 以及處理週數延長至 4 週以上，則兩品種培植體內之去病毒率均可達到百分之百的效果（圖 1）。至於在 Dithiouracil 藥劑處理方面，不管藥劑處理的濃度高低，或處理的時間長短，培植體罹病率均高達 50-100%，且在兩品種四季蔥上均有相同的趨勢。

綜合以上所述，以 25 mg/l Ribavirin 藥劑處理兩週後，對於分蔥潛隱病毒 (*Shallot latent virus*, SLV) 之去病效果以可達令人滿意之結果，且隨著培養時間的延長，培植體內仍然保持無病毒感染的現象。但是在 Dithiouracil 藥劑處理方面，縱使在最高處理濃度以及最長處理時間的條件下，培植體的 SLV 罹病率仍高達 60-90%，在兩品種四季蔥瓶苗上，都有出現相同的趨勢。

(二) 植株生育性狀調查

園藝性狀的調查項目包括鮮重、株高、蔥白直徑及葉片數。

1、植株鮮重變化：

在植株鮮重方面變化如表 1，‘蘭陽 1 號’以 Ribavirin 及 Dithiouracil 兩種藥劑處理 2 週後，其鮮重變化與對照組間並無顯著差異。但是從藥劑處理第 4 週開始，隨著 Ribavirin 藥劑處理濃度的增加及處理時間的延長，植株鮮重有顯著下降的趨勢。Dithiouracil 藥劑處理植株鮮重則是隨著處理時間的延長及處理濃度的增加而增加，且以 Dithiouracil 藥劑處理之植株鮮重顯著的高於 Ribavirin 藥劑處理。

在‘桃園 3 號’方面，經過藥劑處理 2 週後，以 Dithiouracil 藥劑處理之植株鮮重顯著高於 Ribavirin 藥劑處理。隨著 Dithiouracil 藥劑處理濃度的提高及處理時間的延長，植株鮮重隨之增加，Ribavirin 藥劑處理方面則是呈現與 Dithiouracil 相反之結果。

2、株高變化：

在植株高度方面隨著 Ribavirin 藥劑濃度及處理週數的增加，株高具有下降的趨勢，以 100 mg/l Ribavirin 藥劑處理 2 週後，與對照組具有顯著差異。以 Dithiouracil 藥劑處理後，株高則是隨著處理時間的延長而有增加的趨勢，在‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’兩四季蔥品種上，都具有相同之趨勢（表 2）。

3、蔥白直徑：

在蔥白直徑方面變化如表 3，‘蘭陽 1 號’以 Dithiouracil 藥劑處理後其蔥白直徑較 Ribavirin 藥劑處理大，但是蔥白直徑的變化並不隨 Ribavirin 及 Dithiouracil 兩種藥劑處理

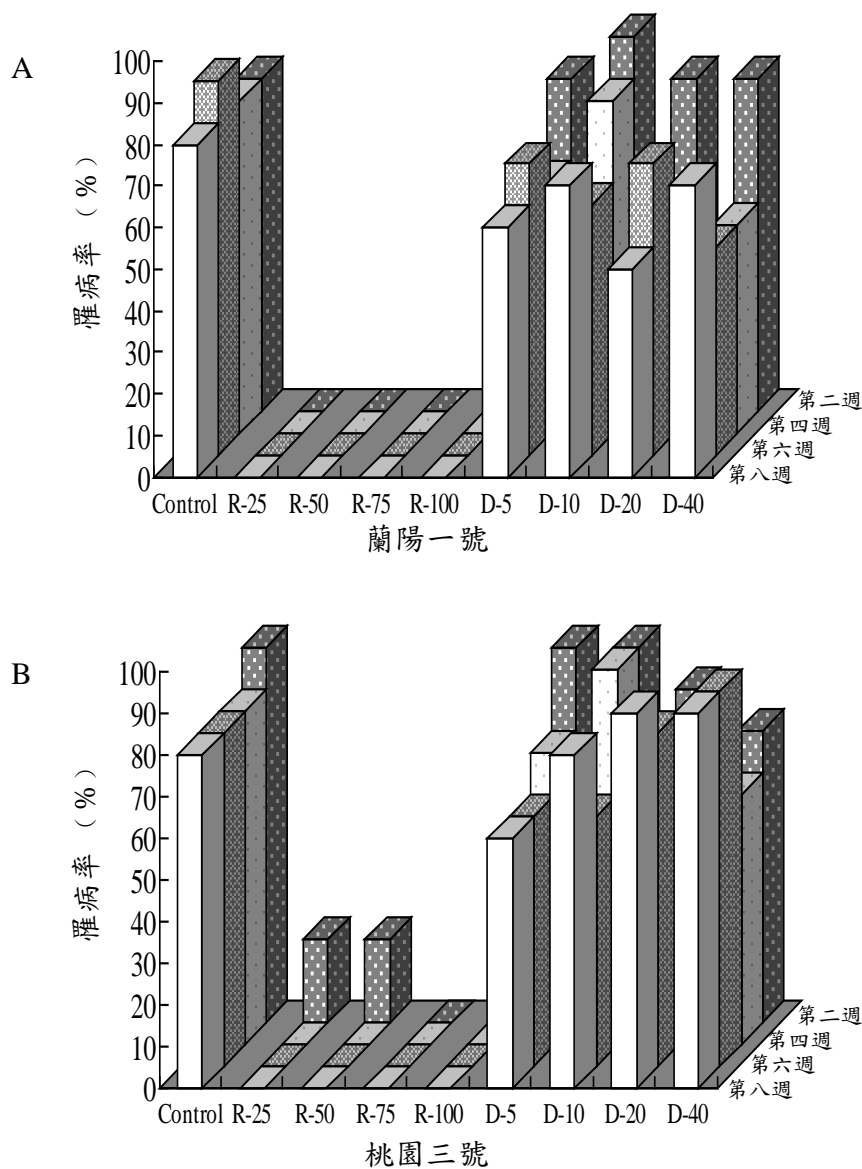


圖 1. 四季蔥‘蘭陽1號’(A)及‘桃園3號’(B)以不同化學藥劑處理2到8週對分蔥潛隱病毒去病率之影響。

Fig. 1. Effect of different chemotherapy 2-8 week on Shalloy latent virus-elimination of green onion ‘LanyangNo. 1’ (A) and ‘Taoyuan No. 3’ (B).

註：英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 1. 不同藥劑處理 2 至 8 週對‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’鮮重之影響

Table 1. Effect of chemotherapy 2-8 week on the fresh weight of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	鮮重(mg)			
		第二週	第四週	第六週	第八週
蘭陽一號	R 25 ^z	102	98	125	109
	R 50	98	92	83	82
	R 75	87	83	77	56
	R 100	84	81	75	53
	D 5	112	220	239	280
	D 10	115	224	244	282
	D 20	128	228	251	288
	D 40	115	231	263	293
	Control	129	178	187	203
桃園三號	R 25	79	73	64	62
	R 50	78	71	59	49
	R 75	77	66	53	48
	R 100	77	63	51	46
	D 5	162	185	190	206
	D 10	162	192	224	226
	D 20	163	171	229	257
	D 40	163	215	237	261
	Control	161	178	219	232
LSD 0.05		37	57	61	110

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 2. 不同藥劑處理 2 至 8 週對‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’株高之影響

Table 2. Effect of chemotherapy 2-8 week on the plant height of green onion ‘Lan Yang No.1’and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	株高(cm)			
		第二週	第四週	第六週	第八週
蘭陽一號	R 25 ^z	5.1	7.6	7.0	6.7
	R 50	4.6	6.5	6.2	5.5
	R 75	3.9	6.0	5.8	5.4
	R 100	3.1	5.6	5.4	5.3
	D 5	4.8	11.0	14.2	12.3
	D 10	6.6	10.6	12.8	14.5
	D 20	5.4	11.6	14.4	14.2
	D 40	6.9	11.8	12.7	14.8
	Control	6.3	9.8	10.1	14.8
桃園三號	R 25	5.2	5.3	5.8	5.5
	R 50	4.4	4.9	5.8	5.8
	R 75	4.0	4.9	5.4	4.9
	R 100	3.9	4.0	4.3	4.1
	D 5	6.3	8.5	10.8	11.8
	D 10	6.6	8.6	11.0	12.1
	D 20	7.3	8.6	11.1	12.6
	D 40	7.4	9.0	11.4	13.9
	Control	5.9	8.3	9.8	9.8
LSD 0.05		1.7	2.2	3.0	2.8

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 3. 不同藥劑處理 2 至 8 週對‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’蔥白直徑之影響。

Table 3. Effect of chemotherapy 2-8 week on the plant diameter of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	蔥白直徑(mm)			
		第二週	第四週	第六週	第八週
蘭陽一號	R 25 ^z	3.9	3.3	4.6	3.8
	R 50	4.1	4.6	3.9	4.7
	R 75	3.7	3.6	4.1	4.1
	R 100	4.0	4.3	3.0	3.8
	D 5	4.0	4.3	5.0	5.2
	D 10	4.1	4.6	4.3	5.1
	D 20	3.6	5.7	4.2	4.0
	D 40	4.4	4.7	5.1	4.3
	Control	4.6	5.0	5.0	5.0
桃園三號	R 25	3.1	3.1	3.0	3.2
	R 50	2.9	3.9	3.3	2.9
	R 75	3.3	3.0	3.4	3.1
	R 100	3.7	4.2	3.3	2.9
	D 5	2.8	4.3	6.7	3.3
	D 10	4.2	4.0	7.0	3.2
	D 20	3.0	3.0	3.6	3.8
	D 40	3.8	3.0	4.2	4.4
	Control	3.6	3.4	6.2	3.4
LSD 0.05		0.8	1.1	1.6	1.4

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 4. 不同藥劑處理 2 至 8 週對‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’葉片數之影響。

Table 4. Effect of chemotherapy 2-8 week on the plant leaf number of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	葉片數(片)			
		第二週	第四週	第六週	第八週
蘭陽一號	R 25 ^z	5.7	3.4	3.7	4.4
	R 50	4.7	4.6	3.0	4.7
	R 75	4.2	4.7	3.8	4.1
	R 100	4.7	4.3	2.6	3.0
	D 5	4.1	6.7	7.3	11.7
	D 10	6.6	8.4	6.8	9.7
	D 20	5.7	11.9	7.3	8.2
	D 40	5.4	7.0	10.7	8.0
	Control	7.7	11.2	7.6	8.8
桃園三號	R 25	4.4	4.9	5.0	4.6
	R 50	3.4	4.0	4.8	4.3
	R 75	4.0	4.6	4.6	3.4
	R 100	3.7	3.9	3.2	3.1
	D 5	5.3	12.2	11.3	8.8
	D 10	5.9	12.3	13.4	6.1
	D 20	3.9	7.6	10.1	11.3
	D 40	4.8	5.6	8.2	14.1
	Control	4.8	8.9	7.0	5.6
LSD 0.05		2.0	2.8	3.2	4.1

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 5. 化學藥劑處理對‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’園藝性狀之影響。

Table 5. Effect of chemotherapy on the horticultural characteristics of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	鮮重 (mg) ^z	株高 (cm)	蔥白直徑 (mm)	葉片數 (片)
顯著性				
品種	*	***	**	ns
藥劑	***	***	***	***
濃度	***	***	***	***
週數	***	***	***	***
品種×藥劑	ns	ns	ns	*
品種×濃度	ns	ns	ns	**
品種×週數	*	***	***	***

^z ns, *, **, *** nonsignificant or significant F test at $p \leq 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

濃度的提高及處理時間的延長而影響，在‘桃園 3 號’方面也呈現相同的結果。

4、葉片數：

在葉片數方面‘蘭陽 1 號’以 Dithiouracil 藥劑處理 2 週後之葉片數較 Ribavirin 藥劑處理高，並隨著處理時間的增加而呈現顯著差異。與對照組比較，使用 Ribavirin 藥劑處理者，葉片數會呈現顯著下降的趨勢，但是葉片數的變化並不受 Ribavirin 及 Dithiouracil 藥劑處理濃度之影響。在‘桃園 3 號’方面也呈現相同的結果（表 4）。

綜合以上結果可得知，於品種間之比較，在葉片數方面之表現並無顯著差異，株高及蔥白直徑方面以‘蘭陽 1 號’顯著高於‘桃園 3 號’。於兩藥劑種類、濃度及不同處理週數間各園藝性狀之比較有顯著差異。在交感部份，品種與藥劑及品種與濃度間，於鮮重、株高及蔥白直徑間無交感效果，但在葉片數方面具有交感，品種與週數間之園藝性狀皆具有交感效果（表 5）。

(三) 葉綠素含量分析

不同藥劑處理 2 到 8 週後，單位葉片鮮重所含葉綠素 a、b 及總葉綠素變化情形以 Dithiouracil 藥劑處理後，葉綠素 a、b 及總葉綠素含量變化並不受藥劑濃度之影響，但是以 Dithiouracil 藥劑處理後之葉綠素 a、b 及總葉綠素含量皆較 Ribavirin 藥劑處理高，兩藥劑在統計上具有顯著之差異。葉綠素 a、b 及總葉綠素含量隨著 Ribavirin 藥劑處理濃度的增加，與處理時間的延長呈顯著下降的趨勢，尤其是以

100 mg/l Ribavirin 藥劑處理者，葉綠素 a、b 及總葉綠素含量顯著的最低，在兩品種四季蔥瓶苗上，都有出現相同的結果（表 6 到 9）。

於表十之統計比較中得之，在品種方面‘蘭陽 1 號’四季蔥葉片中葉綠素 b 含量顯著低於‘桃園 3 號’，葉綠素 a 及總葉綠素方面之表現並無顯著差異。於兩藥劑種類、濃度及不同處理週數間葉綠素 a、b 及總葉綠素之比較有顯著差異。在藥劑種類及濃度方面，以 Dithiouracil 藥劑處理後葉片之葉綠素 a、b 及總葉綠素含量顯著高於 Ribavirin 處理。品種與藥劑種類、濃度及週數間之葉綠素 a、b 及總葉綠素皆具有交感效果。

表 6. 四季蔥‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’以化學藥劑處理 2 週後葉綠素變化。

Table 6. Effect of chemotherapy for 2 week on the chlorophyll contents of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度	葉綠素 a	葉綠素 b	總葉綠素
蘭陽一號	R 25 ^z	0.631	0.104	0.855
	R 50	0.540	0.087	0.759
	R 75	0.440	0.071	0.623
	R 100	0.300	0.045	0.412
	D 5	0.645	0.099	0.880
	D 10	0.737	0.112	0.994
	D 20	0.714	0.106	0.960
	D 40	0.806	0.122	1.089
	Control	0.687	0.111	0.942
桃園三號	R 25	0.539	0.086	0.781
	R 50	0.352	0.065	0.506
	R 75	0.335	0.092	0.488
	R 100	0.286	0.051	0.408
	D 5	0.805	0.120	1.082
	D 10	0.905	0.137	1.222
	D 20	0.730	0.102	0.969
	D 40	0.726	0.103	0.967
	Control	0.739	0.096	0.971
	LSD 0.05	0.105	0.030	0.147

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 7. 四季蔥‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’以化學藥劑處理 4 週後葉綠素變化。

Table 7. Effect of chemotherapy for 4 week on the chlorophyll contents of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	葉綠素 a (mg/leaf g FW)	葉綠素 b (mg/leaf g FW)	總葉綠素 (mg/leaf g FW)
蘭陽一號	R 25 ^z	0.571	0.091	0.794
	R 50	0.549	0.089	0.778
	R 75	0.471	0.076	0.663
	R 100	0.278	0.041	0.38
	D 5	0.682	0.097	0.901
	D 10	0.806	0.112	1.064
	D 20	1.033	0.151	1.379
	D 40	0.951	0.139	1.271
	Control	0.646	0.108	0.910
桃園三號	R 25	0.534	0.096	0.762
	R 50	0.463	0.085	0.666
	R 75	0.372	0.065	0.529
	R 100	0.285	0.052	0.408
	D 5	0.762	0.108	1.013
	D 10	0.757	0.109	1.004
	D 20	0.694	0.093	0.908
	D 40	0.823	0.123	1.109
	Control	0.565	0.100	0.802
LSD 0.05	0.218	0.038	0.314	

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 8. 四季蔥‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’以化學藥劑處理 6 週後葉綠素變化。

Table 8. Effect of chemotherapy for 6 week on the chlorophyll contents of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	葉綠素 a (mg/leaf g FW)	葉綠素 b (mg/leaf g FW)	總葉綠素 (mg/leaf g FW)
蘭陽一號	R 25 ^z	0.589	0.094	0.821
	R 50	0.448	0.071	0.626
	R 75	0.433	0.070	0.602
	R 100	0.267	0.046	0.375
	D 5	0.785	0.116	1.047
	D 10	0.905	0.130	1.201
	D 20	0.895	0.131	1.203
	D 40	0.906	0.140	1.221
	Control	0.716	0.120	1.012
桃園三號	R 25	0.534	0.090	0.751
	R 50	0.403	0.070	0.574
	R 75	0.331	0.059	0.473
	R 100	0.271	0.048	0.386
	D 5	0.954	0.142	1.287
	D 10	1.387	0.237	1.946
	D 20	0.900	0.132	1.203
	D 40	1.090	0.164	1.476
	Control	0.626	0.103	0.876
LSD 0.05		0.264	0.054	0.386

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 9. 四季蔥‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’以化學藥劑處理 8 週後葉綠素變化。

Table 9. Effect of chemotherapy for 8 week on the chlorophyll contents of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	藥劑濃度 (mg/l)	葉綠素 a (mg/leaf g FW)	葉綠素 b (mg/leaf g FW)	總葉綠素 (mg/leaf g FW)
蘭陽一號	R 25 ^z	0.564	0.091	0.793
	R 50	0.423	0.068	0.593
	R 75	0.386	0.061	0.534
	R 100	0.240	0.041	0.336
	D 5	0.885	0.123	1.166
	D 10	0.948	0.134	1.253
	D 20	1.162	0.172	1.553
	D 40	0.934	0.134	1.239
	Control	0.649	0.108	0.915
桃園三號	R 25	0.481	0.077	0.674
	R 50	0.361	0.069	0.533
	R 75	0.353	0.062	0.503
	R 100	0.235	0.042	0.334
	D 5	1.372	0.227	1.907
	D 10	1.157	0.179	1.574
	D 20	1.467	0.263	2.072
	D 40	0.966	0.135	1.274
	Control	0.677	0.090	0.897
LSD 0.05		0.168	0.042	0.248

^z 英文字母 R 代表 Ribavirin 藥劑，D 代表 Dithiouracil 藥劑，Control 為不加任何去病毒藥劑處理，字母後面之數字代表藥劑處理濃度(mg/l)。

表 10. 化學藥劑處理對‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’葉綠素之影響。

Table 10. Effect of chemotherapy on the chlorophyll of green onion ‘Lan Yang No.1’ and ‘Tao Yuan No.3’.

	葉綠素 a (mg/leaf g FW)	葉綠素 b (mg/leaf g FW)	總葉綠素 (mg/leaf g FW)
顯著性			
品種	ns	*	ns
藥劑	***	***	***
濃度	***	***	***
週數	***	***	***
品種×藥劑	***	***	***
品種×濃度	***	***	***
品種×週數	***	***	***

^z ns,*,**,*** nonsignificant or significant F test at $p \leq 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively.

討 論

本試驗將‘蘭陽 1 號’及‘桃園 3 號’兩品種四季蔥罹病株的瓶內增殖芽以含有 Ribavirin 藥劑(0~100 mg/l)之培養基培養 2 到 8 週後，發現‘蘭陽 1 號’以 25 mg/l Ribavirin 之濃度處理 2 週以上，即可完全去除培植體內之分蔥潛隱病毒。‘桃園 3 號’則是以 25 mg/l 及 50 mg/l 處理 2 週後，培植體罹病率可降至 20 %，隨著藥劑處理濃度提高至 75 mg/l 及 100 mg/l 以及處理週數延長至 4 週以上，則兩品種培植體內之去病毒率均可達到百分之百的效果(圖 1)。許多報告也已指出在與本試驗所使用相近之藥劑濃度與處理時間下，對柑橘萎縮病(CTV)、柑橘感染性雜色病毒(CIVV)及柑桔裂皮病類病毒(*Exocortis*)(Greño *et al.*, 1990)、木莓簇葉病(RBDV)(Kudell and Buchenauer, 1989)、蘋果莖凹陷病毒(ASGV)(James *et al.*, 1997)、馬鈴薯捲葉病毒(PLRV)(Griffiths *et al.*, 1990)、竹嵌紋病毒(BaMV)(陳及盧, 2000)、胡瓜嵌紋病毒(CMV)、苜蓿嵌紋病毒(AlfMV)(Simpkins *et al.*, 1981)以及東亞蘭(Lim *et al.*, 1993; Toussaint *et al.*, 1993)、石斛蘭(Porter and Kuehnle, 1997)之東亞蘭嵌紋病毒(CMV)與蘭屬輪點病毒(ORSV)、百合潛隱性病毒(LSV)、鬱金香碎色病毒(TBV)(Blom-Barnhoorn and Aartrijk, 1985)等，具有相同之去病毒效果。

學者們推測 Ribavirin 之所以具有去病毒作用可能的機制有干擾植物病毒的代謝(Toussaint *et al.*, 1993)、在病毒複製的早期階段會減弱病毒 RNA 聚合酶的合成能力，在晚

期階段則會抑制鞘蛋白聚合(Schuster and Huber, 1991)、抑制或干擾病毒的複製(Spiegel *et al.*, 1993)、抑制病毒在植物組織中的系統移行性(Cassells and Long, 1982)、抑制病毒的活性(Hansen, 1989)、抑制病毒 RNA 複製之早期階段、或是抗病毒藥劑在進入植物體內，轉變成抗病毒之有效形式(Lerch, 1987)。如前段所述，目前應用 Ribavirin 藥劑處理後，已經有包括馬鈴薯等十餘種作物能成功地獲得無病毒健康種苗，至於台灣在綠竹(陳及盧, 2000)、大蒜(鄧及陳, 2001)及甘藷(蔡, 1988)上也已經有成功獲得健康種苗之例子。

然而從本試驗結果也發現 Ribavirin 藥劑處理對兩品種四季蔥培植體的生長與葉綠素的含量方面，會有不利的影響，且此不利影響隨著處理濃度的增加以及處理時間延長而越趨嚴重(表 6 至 10)。尤其是以藥劑處理至第 8 週後，兩四季蔥培植體皆出現生長不良的現象。其鮮重及株高只有對照組的 19.8~26.1 % 及 35.8~41.8 % (表 1、2)。前人的研究報告指出，隨著抗病毒藥劑使用濃度的增加，會導致東亞蘭及石斛蘭培植體組織褐化、死亡，且不能形成幼苗(Lim *et al.*, 1993; Porter and Kuehnle, 1997; Toussaint *et al.*, 1993)，使綠竹培植體不定芽生長速度減緩(陳及盧, 2000)，甚至嚴重減少百合鱗莖產量(Blom-Barnhoorn and Aartrijk, 1985)。目前對 Ribavirin 造成前述不利生長現象的原因尚未十分瞭解，不過學者們推測此現象與藥劑使用濃度太高，因而對培植體產生毒害現象有密切的關係。

至於 Dithiouracil 藥劑處理方面，本試驗結果發現對兩品種四季蔥培植體去病毒效果的均不甚理想，以致縱使在最高處理濃度以及最長處理時間的條件下，培植體的 SLV 罹病率仍高達 60-90 % (圖 1)。雖然 Dithiouracil 對園藝性狀方面並無不利之影響，甚至具有提高植株鮮重(表 1)及株高(表 2)之現象，但其仍無法成為一個有效的去病毒藥劑與方法，此現象與前人在石斛蘭上所獲得效果相近(Porter and Kuehnle, 1997)。

綜合本試驗結果顯示，以 25 mg/l Ribavirin 藥劑處理 2 週後，對於分蔥潛隱病毒(*Shallot latent virus*, SLV)之去病效果以可達令人滿意之結果，在‘蘭陽 1 號’之去病率可達 100 %，‘桃園 3 號’之去病效果也可達 80 %，且對於培植體之園藝性狀及葉片內葉綠素含量並無顯著抑制之現象。故本試驗建議以 25 mg/l Ribavirin 藥劑處理 2 週，應可做為四季蔥藥劑去病毒處理之最適當濃度及時間，值得進一步之驗證與探討。

參 考 文 獻

- 陳宥庄、李文汕、張武男。1998。分蔥利用莖頂培養生產無病毒種苗之研究。興大園藝。23：81-91。
- 陳滄海、盧耀村。2000。應用抗病毒藥劑 Ribavirin 於綠竹組織培養去除竹嵌紋病毒。植物保護學會會刊 42：159-168。
- 蔡新聲。1988。植物組織培養在農業上之應用。P.99-114。生物技術專題演講論文集(二)。
- 蔡新聲。2004。組織培養在農業生技產業之應用。p.69-112。植物生技產業應用研討會論文集。

- 鄧汀欽、陳殿義。2001。大蒜病害。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。
- Ayabe, M. and S. Sumi. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.) . Plant Cell Rep. 17: 773-779.
- Blom-Barnhoorn, G. J. and J. V. Aartrijk. 1985. The regeneration of plants free of LSV and TBV from infected liliun bulb-scale explants in the presence of virazole. Acta Hort. 164: 163-168.
- Cassells, A. C. and R. D. Long. 1982. The elimination of potato virus X, Y, S and M in meristem and explant culture of potato in the presence of virazole. Potato Res. 25: 165-173.
- Ebi, M., N. Kasai, and K. Masuda. 2000. Small inflorescence bulbils are best for micripropagation and virus elimination in garlic. HortScience 35: 735-737.
- Greño, V., M. Cambra, L. Navarro, and N. Durán-Vila. 1990. Effect of antiviral chemicals on the sevelopmwnt and virus content of citrus buds cultured in vitro. Sci. Hortic. 45: 75-87.
- Griffiths, H. M., S. A. Slack, and J. H. Dodds. 1990. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in in vitro potato plantlets. Can. J. Bot. 68: 1515-1521.
- Hanson, A. J. 1989. Antiviral chemicals for disease control. Crit. Rev. Plant Sci. 8: 45-88.
- James, D., P. A. Trytten, D. J. Mackenzie, G. H. N. Towers, and C. J. French. 1997. Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. Ann. Appl. Biol. 131: 459-470.
- Kudell, A. R. and H. Buchenaure. 1989. Elimination of raspberry bushy dwarf virus from axillary bud cultures of red raspberry cv. lloyd george by antiviral compounds. J. Pathol. 124: 332-336.
- Lerch, B. 1987. On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin. Antiviral Res. 7: 257-270.
- Lim, S. T., S. M. Wong, and C. J. Goh. 1993. Elimination of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. Ann. Appl. Biol. 122: 289-297.
- Ma Y., H. L. Wang, C. J. Zhang, and Y. Q. Kang. 1994. High rate of virus-free plantlet trgeneration via garlic scape-tip culture. Plant Cell Rep. 14: 65-68.
- Manganaris, G. A., A. S. Economou, I. N. Boubourakas, and N. I. Katis. 2003. Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. Plant Cell Rep. 22: 195-200.
- Mohamed-Yasseen, M., W. E. Splittstoesser, and R. E. Litz. 1994. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell Tissue Org. Cult. 36: 243-247.
- Nagakubo, T., A. Nagasawa, and H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic through in vitro

- bulblet formation. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 32: 175-183.
- Novak, F. J. 1990. Allium tissue culture. Vol. I In: Rabiowitch H D. and J. L. Brewster (eds.) p.233-250. CRC Press.
- Porter, K. G. and A. R. Kuehnle. 1997. Using Dithouracil and Ribavirin to eliminate Cymbidium Mosaic Virus during Micropropagation of 'Uniwai Mist' Dendrobium Orchid. *Hort-Tech.* 7: 161-164.
- Simpkins, I., D. G. A. Walkey, and H. A. Neely. 1981. Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Ann Appl. Biol.* 99: 161-169.
- Spiegel, S., E. A. Frison, and R. H. Converse. 1993. Recent Developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm. *Plant Dis.* 77: 1176-1180.
- Toussaint, A., J. Kummert, C. Maroquin, A. Lebrun, and J. Roggemans. 1993. Use of VIRAZOLE[®] to eradicate odontoglossum ringspot virus from in vitro cultures of *Cymbidium Sw.* *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 32: 303-309.
- Valero, M., A. Ibañez, and A. Morte. 2003. Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue culture. *Sci. Hortic.* 97: 289-296.

Effect of Chemotherapy on the Virus-Elimination in Green Onion 'Lan Yang No.1' and 'Tao Yuan No.3'.

Su-Chuan Shieh¹⁾ Wen-Shann Lee²⁾

Key words : green onion 、 medium 、 chemotherapy 、 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 、
Shallot latent virus

Summary

The objectives of this study was to evaluate the chemotherapy effects of Ribavirin and Dithiouracil on the *Shallot latent virus*-elimination. The shoot tips with three leaf sheath were cut off from *Shallot latent virus*-infected (SLV- infected) plants of two green onion cultivars 'Lan Yang No.1' and 'Tao Yuan No.3'. Results revealed that SLV was eliminated completely by the medium with 25 mg/l of Ribavirin and cultivated for 2 weeks. However, there were adverse effects on fresh weight, height, number of leaf and chlorophyll content of explants as the chemical concentration and cultural period increased. The chemotherapy effect of Dithiouracil was not satisfied at any concentration, although it showed beneficial effect on plant height, fresh weight, leaf number and chlorophyll contents.

1) Graduate student, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

2) Associate Professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University.

Corresponding author.

